

TOVÁBBKÉPZŐ KÖZLEMÉNYEK

Gyógyszerészet 61. 579-587. 2017.

Monoklonális antitest tartalmú termékek fejlesztésének szempontjai az előállításától a készítmények formulálásáig*Katona Gábor, Ambrus Rita, Csóka Ildikó, Szabóné Révész Piroska¹***Bevezetés**

A rekombináns DNS (rDNS) technológia kialakulásával lehetővé vált a humán és a mesterségesen előállított proteinek mikróbákba, illetve növényi- vagy emlős sejtekbe történő beépülése és kifejeződésre jutása (expresszáldása). Ezen felfedezést alapul véve, az elmúlt években jelentősen megnőtt a monoklonális antitestek (mAb) kutatása és fejlesztése. A mAb-ok specifikus sejtvonalból származó immunglobulinok (Ig); biológiai aktivitásukat a ligandumra (általában antigén) jellemző specifikus kötődés jellemzi, ami függhet az immunrendszer válaszáától, például az antitestfüggő sejtes- és a komplementfüggő citotoxicitástól. Mivel célzottan egyetlen antigénhez kötődnek, így kevesebb mellékhatást eredményeznek, mint a hagyományos kismolekulájú gyógyszerek. Rendkívüli jelentőséggel bírnak a diagnosztikában és a gyógyításban, ezért előállításuk és a betegek számára hozzáférhető és alkalmazható készítményekké való formulálásuk új kihívás a szakemberek számára.

A mAb előállítása biotechnológiai úton

Paul Ehrlich a XX. század elején alkotta meg az ún. *magic bullet* elméletét, amely olyan anyagra vonatkozik, amely szelektíven hozzákötődik a patogénhez és a hozzá kapcsolt toxin segítségével specifikusan előli a kórokozót [1]. Az első mAb-okat 1973-ban hozta létre Jerrold Schwaber és George Pieczenik humán-egér hibrid sejtekben, majd Georges J. F. Kohler és César Milstein továbbfejlesztette a technikát, amiért 1984-ben Orvosi Nobel-díjat kaptak (megosztva Niels K. Jerne-vel) [2]. Az antitestek humanizálása (azaz egér és humán szekvenciákat is tartalmazó rekombináns fehérje előállítása) 1988-ban kezdődött Georg Winter munkája révén [3].

Az antitestek termelésére különböző technikákat használnak, az alábbiak szerint:

- egérben – hibridóma sejtek létrehozásával – egér antitestek termelése,
- genetikailag módosított egérben – kiméra/humanizált/humán antitestek termelése és
- „fág display” technika révén – módosított humán antitestek létrehozása.

A cikk áttekintést ad a monoklonális antitestekkel (mAb) kapcsolatos legfontosabb ismeretekről. Külön tárgyalja a mAb-ok biotechnológiai úton történő előállítását és az ehhez kapcsolódó szabályozási hátteret. A mAb tartalmú biológiai készítmények formulálását tekintve pedig a stabilizálásra alkalmazott segédanyagokat mutatja be mind a folyékony, mind a liofilizált forma vonatkozásában. Külön részben kerülnek összefoglalásra a mAb-okat érintő újabb kihívások. A mAb-ok alkalmazása a tumor és egyéb (pl. rheumatoid arthritis, psoriasis) terápiában ma már nélkülözhetetlen, ezért a velük kapcsolatos ismeretek bővítése alapvető szakmai feladat.

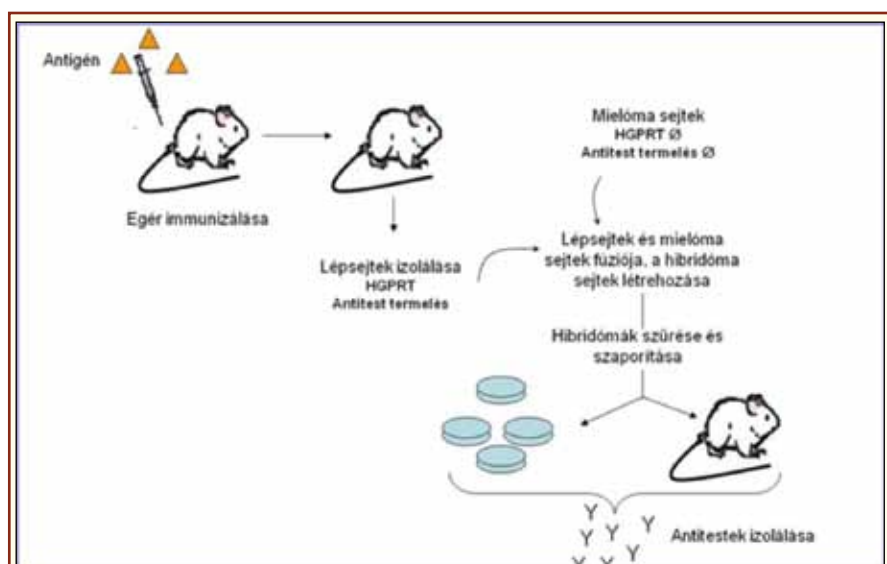
Antitestek termelése hibridómákban

A hibridóma olyan immortalizált (korlátlan szaporodású, rákos szövetből származó sejt) antitest termelésre alkalmas sejt, amely mielóma sejt (korlátlan osztódást biztosít) és immunizált egér lépsejt (antitest termelésre képes) fúziójával keletkezik. Az egeret immunizálják a megfelelő antigénnel, majd az egerből izolált lépsejteket fuzionáltatják mielóma sejtekkel. A mielóma sejtek nem tartalmazznak hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) enzimet, ezért csak a fúziós sejtek tudnak túlélni a speciális médiumban [4]. A nem fuzionált B sejtek is tartalmazzák ezt az enzimet, de élettartamuk rövid, gyorsan elpusztulnak. Az előállított hibridóma sejteket tovább szaporítják és az általuk termelt antitesteket a tápfolyadékából kinyerik [5]. A módszerrel egér monoklonális antitestek nyerhetők (**I. ábra**). Ez a módszer az antitest termelés egyik legelterjedtebb módja, elsősorban diag-



Katona Gábor 2013-ban kapott gyógyszerész diplomát a Szegedi Tudományegyetemen. 2017-ben PhD fokozatot szerzett a Gyógyszer-technológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézetben. Kutatási területe a pediátriában alkalmazható paracetamol tartalmú szilárd gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése konvencionálisan alkalmazott technológiák, mint a porlasztva- és fagyasztva szárítás, valamint az olvadék technológia alkalmazásával. Jelenleg egyetemi tanársegédi pozícióban dolgozik az Intézet nanotechnológiai kutatócsoportjában.

¹ Kapcsolattartó: email: revesz@pharm.u-szeged.hu



1. ábra: Antitestek termelése hibridómákban [6]

nosztikus és egyéb antitestek termelésére javasolt. Terápiás antitestek termelésére kevésbé használatos, ugyanis többszöri alkalmazás során allergiás reakciók léphetnek fel, egér ellenes humán antitestek (HAMA – human anti mouse antibody) képződhetnek. A HAMA-t csak 8-12 nappal a kezelés után lehet kimutatni, a csúcskoncentráció 25-30 nap után jelentkezik.

Humanizált antitestek

A humanizált antitest egy olyan rekombináns fehérje, amely egér és humán szekvenciákat egyaránt tartalmaz. A kiméra antitestek 75%-a, a humanizált antitestek kb. 90%-a humán. A humanizálás folyamán az egér antitest egyes részeit humánra cserélik azzal a céllal, hogy az egér ellenes humán antitestek (HAMA) termelődését kivédjék; az antitesteket általában emlős sejtkultúrákban termeltetik. Nagy előnye, hogy nem lép fel nem humán fehérjék elleni immunreakció. A termelés *in vitro* is megvalósítható.

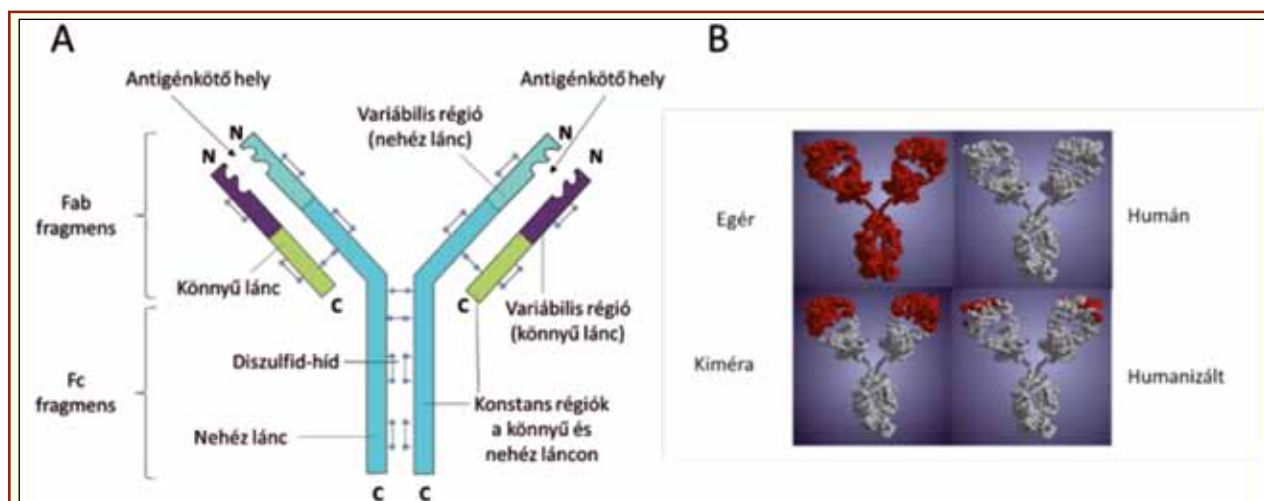
A „fág display” technika

Olyan *in vitro* molekuláris biológiai technikáról van szó, amelynek során a fág felszínén, fúzióval, különböző fehérjék/peptidek jeleníthetők meg. Antitestek termelésére azért alkalmas, mert az ún. fág könyvtárakkal elérhető lehetséges kombinációk száma hasonló (vagy nagyobb) az élő szervezetben előforduló lehetséges kombinációk számánál. Jól tervezhető rendszer, amely lehetőséget biztosít a különböző tulajdonságokkal és kötődési képességekkel rendelkező antitestek létrehozására és termelésére [7]. A

leggyakrabban az M13 fágot használják e célra, amely beépül a baktérium genomjába és csak növekedés csökkenést eredményez.

A mAb szerkezete és nevezéktana

A mAb-ok alapváza egy „Y”-alakú monomer, amely két egyforma felépítésű nehézláncból és két egyforma könnyű láncból áll (2. ábra). Az egyes láncokat egymással diszulfid-hidak kötik össze, amely összesen hat-nyolc konstans régiót és négy variábilis régiót jelent. Az „Y” ágainak végeit Fab fragmens-nek hívják, amely a nehéz- és a könnyű-lánc egy-egy variábilis és konstans régiójából áll és együttesen alkotja az antigén kötő helyet a monomer N-terminális végén. A két variábilis régió a nekik megfelelő antigént köti. Az Fc fragmens – ami az „Y” alapját adja –, két nehézláncból áll, illetve két/ három régióból áll; a különböző sejtek receptoraihoz és a komplement fehérjékhez kapcsolódik. A kapcsolódás következtében az ellenanyag kü-



2. ábra: A mAb-ok felépítése (A) [9] és a terápiában használt antitestek különböző típusai (B) [10]

I. táblázat

A mAb-ok nevezéktana

Előtag	Célpont	Eredet	utótag
Változó	-ki(n)-interleukin	xi-kiméra antitest zu-humanizált antitest u-humán o-rágcsáló	-mab
	-ci(r)-kardiovaszkuláris		
	-co(l)-vastagbél tumor		
	-neu(r)-idegrendszer		
	-li-immunmoduláns antitest		
	-tu-tumor ellenes antitest		

lönböző hatásokat vált ki, mint például opszonizáció (megjelölés a makrofágok számára), sejtlyízis (sejtszét-esés), degranuláció (hízósejt, basofil- és eozinofil-granulociták kiürítik a mediátor anyagaikat) és egyéb folyamatokat [8].

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a mAb-ok speciális szerkezetére utaló rövidítéseket tartalmazó nevezéktant alkotott az egységes alkalmazás céljából (*I. táblázat*) [11].

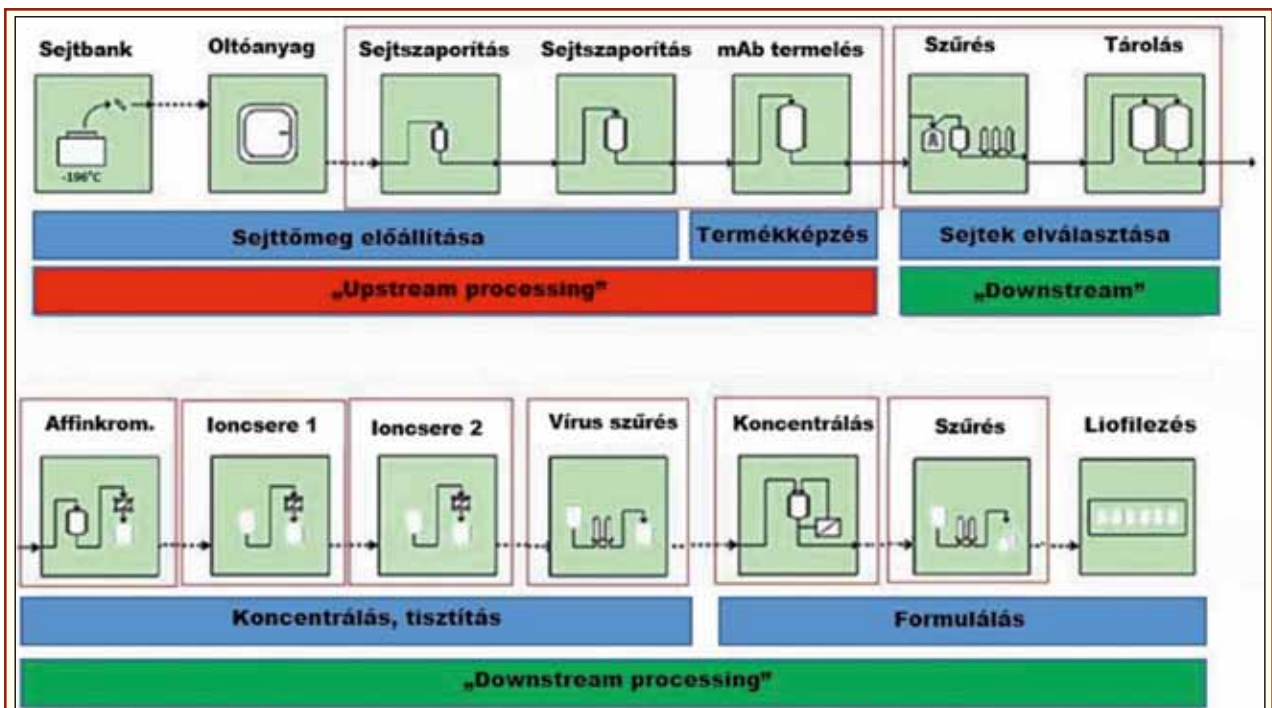
A mAb előállítása

A törzs-sejtbank a mAb-okat termelő sejtvonal homogén szuszpenziója, amelynek egyenlő térfogatrészeit eltartás céljából egyszeri művelettel egyedi ampullákba osztják szét és folyékony nitrogén segítségével -196 °C-on tárolják. Ezt követően kiválasztanak egy, a megfelelő sejtvonalat tartalmazó ampullát a sejtbankból és felolvasztják. Következő lépés a sejtszaporítás lombikban, majd egyre nagyobb fermentorokban. A sejtszaporítás, azaz a mAb termelése történhet rátáplálásos, félfolyamatos és folyamatos módszerrel, vagy sejtvisszatartással. Ezt követően a sejttörmelékeket szűréssel leválasztják. A sejteket 0,65 µm pórusmére-

tű mikroszűrővel választják el. Az oldott fehérjéket a sejtek közül foszfát oldattal mossák ki. Az antitesteket olyan affinitás kromatográfiás tölteten kötik meg, amelynek liganduma a Staphylococcus protein A fehérjeje. Ez az antitestek közös, Fc régiójához kapcsolódik, azaz minden antitestet megköt, más fehérjéket viszont nem. A megkötött antitesteket először kationcserélő- majd anioncserélő kromatográfiával tisztítják, majd vírusmentesítik nanoszűrővel. A fermentlé mAb koncentrációja 100–150 mg/l. A végtermékben 10-20 g/l-re van szükség, ezért koncentrálni kell, melynek legkíméletesebb módja az ultraszűrés. A mAb móltömege 180-190 kDa, a szűréshez tehát ez alatti vágású membrán szükséges. A koncentrált követően a készítménnyé formulálás következik, különböző segédanyagok hozzáadásával, majd egy utolsó steril szűrés és szilárd forma esetén liofilezés következik (*3. ábra*).

A mAb fejlesztésével és gyártásával kapcsolatos szabályozás

A fejlesztés során alaposan fel kell térképezni a szerkezetet, a hatásmechanizmust, a biológiai aktivitást,



3. ábra: A mAb-ok előállításának főbb lépései [12]

stabilitást és az immunkémiai tulajdonságokat. Gondosan mérlegelni kell továbbá az immunválasz kiváltásának kockázatát. Ez különösen akkor érvényes, ha a termék nem rendelkezik magas humán immunoglobulin-homológiával vagy ha potenciálisan immunogén antitest kötőhelyet azonosítanak a szerkezetben, ami klinikai mellékhatásokat eredményezhet és/vagy módosíthatja a terápia hatásosságát. A mAb-ok előállításához használt sejtszubsztrátnak stabil és folyamatos monoklonális sejtvonalból, sejtbankból kell származnia, amelyet rDNS vagy más alkalmas technológiák segítségével fejlesztettek ki. Ha a sejt szubsztrátját rDNS-technológiával állítják elő, az antitestek előállításához használt expressziós rendszer leírását az EMA (Európai Gyógyszerügynökség) rDNS technológia által termelt gyógyszerkészítmények előállítására és minőségellenőrzésére vonatkozó 3AB1A irányelv, és az ICH (*International Council for Harmonization*) guideline Q5A (virális biztonság), a Q5B (expressziós konstrukciók) és a Q5D (sejt szubsztrátok) vonatkozó iránymutatásai szerint kell végezni [13].

A készítmény gyártás szempontjából a forgalomba hozatali engedély iránti kérelem benyújtása időpontjában a gyártónak megfelelő, sajátos referenciaanyagokat kell biztosítania, amelyek a gyártási tételek biológiai és fizikai-kémiai vizsgálatához összehasonlításként szolgálnak. A mAb-ok alapos jellemzéséhez az ICH Q6B iránymutatása szerint meg kell határozni a fizikai-kémiai és immunkémiai tulajdonságokat, a biológiai aktivitást, a tisztaságot és a szennyezők mennyiségét. A fizikai-kémiai jellemzés magában foglalja a mAb primer struktúrájának (osztály, alosztály, könnyű lánc összetétel) a meghatározását. Az aminosav szekvenciát kísérletileg megfelelő módszerekkel meg kell határozni; pl. peptid leképezéssel, tömegspektrometriás analízissel. Elemezni kell az N- és C-terminális aminosav szekvenciák változékonyságát. Fontos a szabad szulfhidril csoportok, diszulfidhidak és a szénhidráttartalom, valamint a glikolizációs helyek meghatározása. Jellemzően, a mAb-ok a nehéz láncon belül egy N-glikozilezési helyet tartalmaznak az Fc régióban. A gyártásra vonatkozó szabályozások szerint a gyártási folyamatot megfelelően le kell írni és validálni kell. Fókuszálni kell a gyártás közbeni ellenőrzésre („*in process control*”) (beleértve a termékminőségi jellemzőket és a folyamat paramétereit). A validálási vizsgálatoknak legalább a következőkre kell kiterjedniük:

- bizonyítani kell, hogy az eljárás alkalmas, megfelelően meghatározott ellenőrzési stratégia szerint, konzisztens minőségi termék előállítására;
- biztosítani kell a folyamat termelékenységét (pl. a folyamathoz kapcsolódó szennyeződések, vírusok eltávolítása);
- demonstrálni kell, hogy minden egyes gyártási művelet/egység megfelelő módon működjön (pl. a tisztító oszlop validálása, aszeptikus töltés).

A mAb-ok stabilitása

Mivel a mAb fehérjetermészetű anyag, így különböző tényezők hatására, mint pl. melegítés, fagyasztás, fény, pH és egyéb mechanikai behatások esetén fizikai és kémiai változásokat szenvedhet.

A fizikai változások közé soroljuk a denaturációt, az adszorpciót, aggregációt és a precipitációt. A mAb-ok esetében elsősorban az aggregációval kell számolni. A kémiai változások között meg kell említeni a hidrolízist, a deamidációt, az oxidációt, a racemizációt, az izomerizációt stb. A mAb tartalmú készítményekben elsősorban oxidáció, deamidáció és fragmentáció mehet végbe, amelyekkel a formulálás során reális rizikóként számolnunk kell és figyelembe kell venni a fejlesztés folyamatában.

Aggregáció

Folyékony készítményekben a fehérjék aggregációját több tényező is előidézhetheti. Különböző koncentrációban alkalmazott proteinek formulálása intravénás (i.v.), intramuscularis (i.m.) és subcutan (s.c.) beviteli módra alkalmas formákban valósítható meg. Az antitestek alkalmazása kezdetben közepes koncentrációban (1-10 mg/ml) történt, ahol nem jelentkeztek hátrányos aggregációs folyamatok. A krónikus terápia azonban a mAb-ok nagyobb koncentrációban történő alkalmazását igényelte, így az s.c. történő beadási mód és az injekciós formulálás került előtérbe. Ezzel az aggregáció mértéke fokozottabbá vált. Bizonyos összetételű, 50 mg/ml-nél nagyobb koncentrációjú protein oldatok esetében nagyobb viszkozitással is számolni kell, amely egyrészt befolyásolja a beadási módot, másrészt stabilitási problémákat indukálhat. Megemlítendő, hogy léteznek ettől függetlenül olyan összetételek is, ahol a 100 mg/ml koncentráció ellenére, a stabilitás és az i.m. beadási mód problémamentesen biztosítható. A fehérje-fehérje kontaktus mértéke a koncentráció emelkedésével nő. Ezeket a kapcsolódásokat dimerizációval, trimerizációval lehet stabilan megtartani. Nemcsak a növekvő koncentráció, hanem a hőmérséklet emelkedése is fokozza az energetikailag kedvezőbb aggregációt. Néhány antitest esetében az alacsony hőmérséklet reverzibilis önrendeződésre (gyenge ionos és hidrofób interakciók) hajlamosít, ezeket „krio-immunoglobulinoknak” nevezik. Megfigyelhető, hogy az aggregáció mértékét az enyhén lúgos kémhatás (pH 7,5-8,5) fokozza, míg a savasabb (pH 6,5-7,5) csökkenti. Nagy só koncentráció (1M NaCl) szintén fokozhatja ezen anyagok dimerizációját [14].

Oxidáció

Általában a fehérjék és ezáltal a mAb esetében metionin és cisztein maradvány okozhat gyakran oxi-

dációs problémát. A metionin az Fc domént hajlamossíthatja oxidációra, metionin szulfoxid keletkezésével. Míg a cisztein az Fc szerkezetben van jelen diszulfid párként, addig a páratlan cisztein azonban különböző régiókban oxidációs folyamatot válthat ki. Hasonlóan hisztidin, tirozin, triptofán és fenilalanin maradványok oxidációhoz vezethetnek [15].

Deamidáció

Glutamin és főként aszparagin maradványok mutatnak hajlandóságot a deamidációra. A fény és a mAb-ok nehézláncai közötti interakció vezethet ezen aminosavak deamidációjához. Jellemző az aszparagin gyors hidrolitikus átalakulása aszparaginsavvá savi pH-n, ami lassú neutrális pH-n fehérje bomlásához vezet. A deamidáció jelenti a fő forrását, továbbá a mAb töltési heterogenitását. Formulálás szempontjából a pH és az ionerősség azok a tényezők, amelyek változtatásával a deamidáció mértéke minimalizálható [16].

Fragmentáció

A peptidkötés általában stabil, csak nagyon savas körülmények között és magas hőmérsékleten következik be a fragmentáció. Enyhe savas körülmények között, ahol az aszparaginsav maradékok nem ionizáltak, az aszparaginsav peptidkötések hasadása 100-szor gyorsabb, mint az egyéb peptidkötések esetén, leggyakrabban aszparaginsav-glicin és aszparaginsav-prolin aminosavak közötti kapcsolat eredményez fragmentációt. Azt is kimutatták, hogy az aszparaginsav maradékok hasításának aktivációs gátja ~ 10 kcal / mol-lal alacsonyabb, mint az aszparagin esetében, ami arra utal, hogy a fragmentáció általában az aszparagin maradék aszparaginsavvá történő deamidációja után következik be [17].

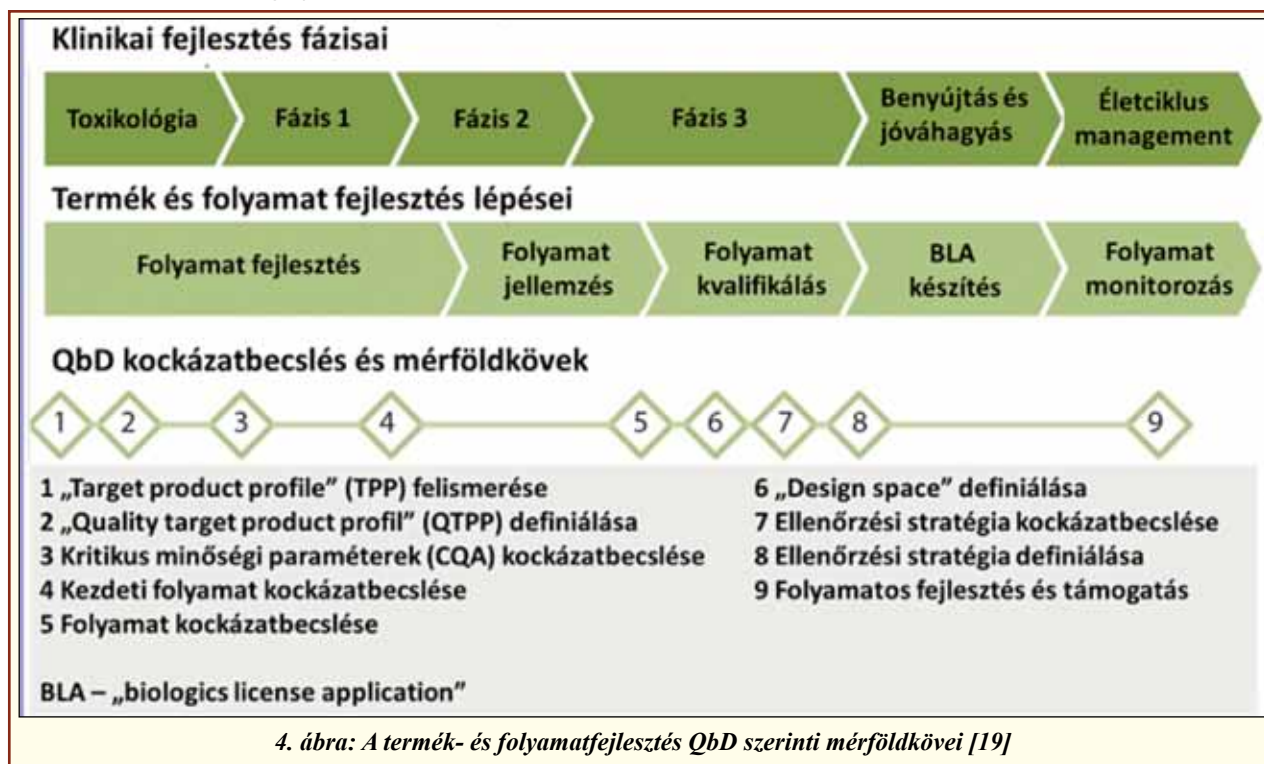
nyabb, mint az aszparagin esetében, ami arra utal, hogy a fragmentáció általában az aszparagin maradék aszparaginsavvá történő deamidációja után következik be [17].

mAb tartalmú készítmények formulálási szempontjai

Mivel a mAb-ok fehérje természetű anyagok, ezért hasonló formulálási szempontokat kell figyelembe venni, mint egyéb fehérje típusú hatóanyagok feldolgozásánál. A késztermék két formában kerülhet forgalomba, folyékony gyógyszerformában, vagy szilárd liofilizátumként. A végső formát a „Target Product Profil” (TPP), azaz a termék profiljának minőség alapú előzetes meghatározása szabja meg, amelyet piackutatás, formulálás és módszerfejlesztés útján határoznak meg „Quality by design” (QbD) módszerrel, vagyis a termék minőségét tervezés (fejlesztés) útján kell biztosítani. A cél egy olyan gyártási folyamat megtervezése, amely folyamatosan biztosítani tudja a termék előre meghatározott minőségét [18]. A QbD megközelítés olyan eszközöket kínál, amelyek mind a fejlesztési, mind a gyártási tevékenységeket támogatják. Párhuzamosan fut a klinikai fejlesztés a termékfejlesztési folyamatokkal az ICH Q8 (R2), Q9, Q10 és Q11 irányelvek előírásai szerint. A 4. ábra bemutatja a biológiai gyógyszerek különböző fejlesztési szakaszait végig az engedélyezésig.

Segédanyagok a készítmények előállításában

A proteinek stabilizálására különböző segédanyagok alkalmazhatóak mind az oldatos forma, mind a liofiliz-



zátum formulálása során, kezdve a gyógyszerforma előállításához szükséges anyagoktól, a célzott hatást segítő segédanyagokon át egészen pl. injekciók esetén a beadási fájdalmat csökkentő szerekig stb. Néhány alapvető segédanyag-csoport kerül ismertetésre a következőkben.

A pH beállítására alkalmazott anyagok

A degradációs folyamatok, mint a deamidálás vagy az aszparaginsav izomerizáció pH-függő, ezért olyan segédanyagokat kell alkalmazni, amelyek szabályozzák a pH-t. Erre a célra leggyakrabban puffereket használnak. Ide tartozik az acetát-, citrát-, szukcinát- (pH 3-6), foszfát-, hisztidin- (pH 6-8), trisz- (hidroximetilaminometán) és karbonát puffer (> 8 pH). A kémhatás beállításánál gyakran alkalmaznak foszforsavat vagy nátrium-hidroxidot. Ez utóbbi esetben ügyelni kell arra, hogy a mAb érzékeny erős savakkal és lúgokkal szemben, ezért a kémhatás beállításánál ezen komponensek vizes oldatát alkalmazzák, a hatóanyagot pedig az alacsony sav / lúg koncentrációjú oldatban oldják. Szacharóz tartalmú összetételek esetében nem alkalmaznak puffereket. A puffer-koncentráció általában alacsony (10-30 mM), ami elegendő pufferelést biztosít tárolás közben, az alkalmazás helyén pedig lehetővé teszi az oldat pH-jának gyors változását. Néhány só, mint például a dinátrium-foszfát hajlamos a kristályosodásra fagyasztáskor, és ez nagyban befolyásolja a fehérje stabilitását a fagyasztás és felolvasztás során.

Izotonizálásra alkalmazott anyagok

Leggyakrabban nátrium-klorid vagy kálium-klorid az alkalmazott komponens erre a célra. Szokásos mennyiségük 50-200 mM, felhasznált mennyiségük az alkalmazott többi komponens koncentrációjától függ. A mannit és a glicin opcionálisan alkalmazható folyékony formák esetében, ezek az anyagok inkább a liofilizált formánál fordulnak elő. Oldat gyógyszerformánál a mannit 5-50 mg/ml koncentrációban használatos, glicin esetében a szokásos koncentráció 0-7 mg/ml. További komponensek lehetnek a cukrok és cukoralkoholok valamint egyéb anyagok pl. laktóz, szacharóz, trehalóz, szorbit, xilit, ribitol, mioinozitol, galaktitol, diolok (pl. 1,2-propilén-glikol), ammónium-acetát [20].

Nemionos felületaktív anyagok

A nemionos felületaktív ágenseket széles körben alkalmaznak aggregáció gátlás és újrastrukturálás elősegítése céljából. A poliszorbát 20 és 80 gyakran megtalálhatóak a forgalmazott készítmények komponensei között 0,0003-0,3%-ban [21]. Más segédanyagok is

szóba jöhetnek, például Brij 35, Triton X-10, Poloxamer 188 és nátrium-dodecil-szulfát. Ezek a nemionos felületaktív anyagok megóvják a proteint a felületi (mozgatás, rázás) és a stressz hatás (fagyasztás, liofilizálás és rekonstrukció) által indukált aggregálódástól. Kockázatot jelent viszont, hogy a gyakran alkalmazott poliszorbátok degradálódhatnak oxidáció és hidrolízis folytán, ezért bomlástermékük stabilitási problémákat okozhat.

Mikrobiológiai tartósítószer

A konzerváló szerek biztosítják az egyszeri és többadagos készítmények mikroorganizmus mentességét, pl. benzilalkohol, m-krezol és fenol. Ki kell azonban hangsúlyozni, hogy a tartósítószer gyakran protein aggregációt okozhatnak bizonyos koncentrációban, hőmérsékleten az idő függvényében. Így a benzilalkohol nagyon gyorsan indukál aggregációt a rekombináns IL-1 receptor antagonisták esetében. Szacharóz ko-szolvensként történő alkalmazásával elnyomható a tartósítószer hátrányos hidrofób sajátossága, amely az instabilitás oka lehet.

Protein stabilizáló segédanyagok

Az alkalmazásra kerülő segédanyagok (poliolok, cukrok, aminosavak, aminok stb.) a fehérjék natív formáját stabilizálják. Általában 0,1 M – 1 M koncentrációban fejtik ki protektív hatásukat vizes közegben. Növelik a

II. táblázat
Különböző segédanyagok alkalmazási gyakorisága
a mAb-ok formulálása során [24]

Segédanyag	Folyékony forma (%)	Liofilizált forma (%)
Poliszorbát 80	62	45
Poliszorbát 20	12	36
Poloxamer 188	4	0
Mannit	8	9
Szorbit	0	9
Szacharóz	15	82
Trehalóz	12	18
Dextróz	0	9
Dextrán 40	0	9
NaCl	62	18
Arginin	12	0
Glicin	12	0
Metionin	4	0
Aszkorbinsav	4	0
Nátrium-acetát	0	9
Foszfát-puffer	35	27
Citrát-puffer	12	9
Acetát-puffer	23	0
Tris-puffer	4	0
Szukcinát	0	9
Hisztidin	38	27

fehérje olvadáspontját, csökkentik az enzim aktivitást és a fehérje aggregációt. Bizonyos segédanyagok, réteget alkotva a proteinek felületén kirekesztik a felesleges vizet. Ez a folyamat kifejezetten a polimerekre, mint ko-szolvensekre igaz. Számos cukor, poliol és só mutat tasztító interakciót, amely által a proteinek felületéről lezorolnak [22]. Az aminosavak különböző mechanizmusokkal stabilizálnak: direkt proteinkötés, puffer kapacitás, antioxidáns hatás és kedvező lezorítás. A hisztidint pufferanyagként alkalmazzák antitest tartalmú készítményekben, és mint antioxidáns, megtisztítja a hidroxil gyököktől az oldatot. A glicin is alkalmas pufferelő szer, de térfogatnövelő anyagként is alkalmazható liofilezés során. Az arginint már széles körben használják szolubilizálószerként a tisztítási lépések során, valamint mobil fázis komponenseként a HPLC analitikában. Az arginin esetében igazolták, hogy rendkívül hatékony a szuppresszív aggregációnál [23], csökkenti a fehérje aggregálódását hő- vagy karbamid-indukálta denaturálás esetén, de ezzel nem növeli a fehérje termikus stabilitását.

Forgalomban lévő mAb segédanyagok

A következőkben áttekintést nyújtunk a forgalomban levő mAb készítmények segédanyagairól. *Kang* és munkatársai 37, a terápiában gyakran alkalmazott mAb formuláció esetében (magában foglalva fragment antigén kötést és antitest-hatóanyag konjugátumokat is) 25 folyékony és 12 liofilezett terméket vizsgáltak. Általában a mAb koncentráció 2-200 mg/ml között található. A **II. táblázat** a segédanyagok százalékos alkalmazási gyakoriságát mutatja be az egyes formulációk tekintetében [24].

A hisztidin és a foszfát-puffer minden harmadik összetételben szerepel kb. 30%-os gyakorisággal. A legtöbb esetben (80%) a felületaktív anyagok közül a poliszorbát 80, 20 és Poloxamer 188 kerül alkalmazásra. Minden fagyasztva-száritott készítmény tartalmaz polioloikat/diszacharidokat/poliszacharidokat, mint például mannit, szorbit, trehalóz, szacharóz és dextrans 40. A leggyakoribb ezek közül a szacharóz, amely a liofilezált termékek több mint 80%-ában van jelen. A cukrok a szükséges térfogatot biztosítják, valamint stabilizálják a fehérjét. A polioloikat/diszacharidok/poliszacharidok csoportja a folyékony összetételek 30%-ában is megtalálható. A sók közül a NaCl kerül gyakran felhasználásra (~50%). Két aminosav (arginin és glicin) az esetek kb. 20%-ában van jelen. Az antioxidánsok közül az aszkorbinsav, metionin, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) kerül alkalmazásra. A kelátképzők feltehetően megelőzik a nehézfém indukálta oxidációt. Szükséges megjegyezni, hogy az említett anyagok kisebb gyakorisággal fordulnak elő; rendszerint a három antioxidáns együttesen is használható [25].

Kihívások a mAb-ok előállítására és alkalmazására

Injekciós készítmények (oldatos rendszerek és liofilizátumok)

Napjainkig az antitestek alkalmazása elsősorban injekciós i.v., i.m., és s.c. és infúziós beadási módokra korlátozódott. Az s.c. bevitel azoknál a mAb-oknál indokolt, amelyek i.v. beadást követően gyakran nem várt mellékhatások jelentkeztek. Az s.c. alkalmazás általában kisebb mennyiségre korlátozódik, amely nem haladja meg az 1,5 ml-t, azonban a szöveti ellennyomás, szivárgás következtében gyógyszeresztés következhet be és fájdalmat okozhat a beadás helyén. Ezen fájdalom csökkentésére törekszik számos gyógyszergyártó, mind a segédanyagok változtatásával, mind pedig a beadási térfogat csökkentésével. Példaként az adalimumab tartalmú Humira® (Abbvie) készítményt említhető, amelyet reumatológiai, gasztroenterológiai és dermatológiai indikációkban is alkalmaznak. A s. c. adagolású gyógyszert a betegek saját maguk alkalmazzák és a beadás kényelmesebbé tételért nemrég egy új, nagyobb koncentrációjú, citrátmentes formulát fejlesztettek ki. A klinikai vizsgálatok összesített adatai alapján statisztikailag szignifikáns különbséget figyeltek meg az injekció beadásának helyén fellépő azonnali fájdalomban az adalimumab 40 mg/0,8 ml és az adalimumab 40 mg/0,4 ml formulációi között ($P < 0,001$). Ez utóbbi készítmény 84%-os medián fájdalomcsökkenést mutat az injekció beadásának helyén, ami jobb együttműködést eredményezett a kezelt betegeknél [26, 27].

A terápiás aktivitás növelése érdekében nagy koncentrációjú mAb injekciós készítmények (100 mg-1000 mg/dózis) előállítása a cél, ami újabb kihívást jelent a gyártóknak. Ezt a nagy dózist s.c. alkalmazás esetén kevesebb, mint 1,5 ml térfogatban kell formulálni (FDA követelmény) és a koncentráció lehetőség szerint haladja meg a 100 mg/ml-t [28]. A fő kihívást az injekciós oldat előállítása, annak stabilizálása, alkalmazhatósága és nem egyszer az analitikai vizsgálat kivitelezése jelenti.

Mivel oldatos forma előállítása a cél, s a készítmény akkor elfogadható, ha az vizuálisan tiszta és nincs benne szedimentálódott részecske még 30.000 G, 30 perces centrifugálás után sem, ezért növelni kell a mAb oldékonyságát (pl. szacharózzal). Általában a készítmények hipertóniások, tehát szükség van izotonizálásra is. A mAb oldékonyságának növelésénél annak konformációja is változhat. Hipertóniás készítmény vagy az ionerősség megváltoztatása a protein aggregálódásához vezethet.

A nagy koncentrációjú mAb oldatok nagy viszkozitásúak, ez nagyobb gyártási veszteséget jelenthet, ami a költségeket növelheti. Szűrési problémák is (ultra-

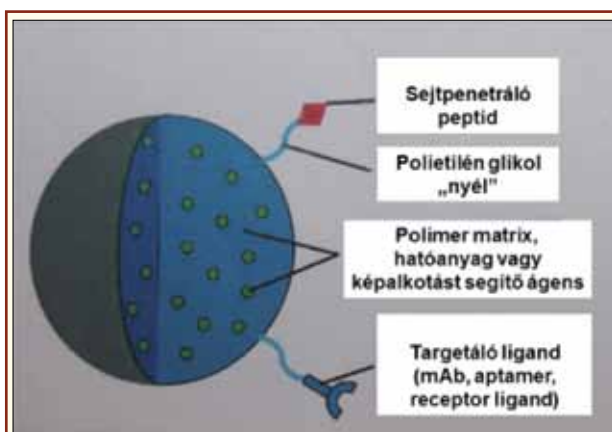
filtráció) adódhatnak pl. eltömődik a szűrő, hosszabb szűrési idővel kell számolni. Célszerű az oldat viszkozitását csökkenteni pl. pH változtatással, pufferek, sók, aminosavak és cukrok alkalmazásával, valamint a hőmérséklet emelésével. Ez mind további stabilitási problémát vethet fel. Amennyiben liofilezésre van szükség, akkor az a költségeket tovább növeli. A nagy viszkozitású oldat alkalmazási nehézségeket (tű lumen, veszteség a fecskendőben) is jelenthet.

Ha az oldatos és a liofilizált készítmények alkalmazhatóságát tekintjük, akkor kihívást jelent az is, hogy saját alkalmazás esetén a betegek elsősorban az oldatos formát fogadják szívesebben. Az oldatos forma alkalmazása kényelmesebb a végfelhasználók számára, és javítja a betegek compliance-ét, mivel a termék feloldása nem szükséges. Ezen kívül az adagolási pontosság is jobb lehet, mint egy feloldandó szilárd adagolási forma esetében, mivel jelentős mértékű hiba léphet fel az oldás során hozzáadott térfogat mérésakor. A liofilezett termék esetében beadás előtt készül el az injekciós készítmény. Az oldószer hozzáadása során azt a porampulla falán kell lecsorgatni a liofilizátumra, s az oldás során erőteljes rázást nem szabad alkalmazni, csak meghatározott számú óvatos keverő mozdulat végezhető. Csak a tiszta, üledékmentes oldat használható fel. Tehát ebben az esetben is fokozottan szükséges az együttműködés a beteg részéről.

Antitesttel funkcionizált nanohordozók

A nanohordozók olyan nanostrukturált egységek (liposzóma, viroszóma, nanokapszula, polimer micella stb.), amelyek mind a belsejükben, mind a felületükön megköthetnek bizonyos anyagokat, pl. a mAb-okat is. Ezáltal mAb-bal funkcionizált nanoanyagok lesznek, amelyek a célzott terápiában nagy jelentőségűek. A targetálást segítik az egyéb ligandok is pl. a sejtpenetráló peptid stb. (5. ábra).

A funkcionizált nanohordozók egyik csoportja-



5. ábra: Antitesttel funkcionizált nanohordozó vázlatos képe [29]

ba tartoznak azok a rendszerek, amelyekhez tumor diagnosztikában is alkalmazható mAb köthető. Ilyen pl. a trastuzumab-bal funkcionált nanorészecske. Példánkban a nanorészecske mágnesezhető magot tartalmaz, ami lehetővé teszi a mágneses rezonancián alapuló képalkotást. Az antitest szelektíven kötődik a 2-es típusú humán epidermális növekedési faktor receptornak nevezett (HER2) antigénhez, ami bizonyos daganatos sejtek felületén található. A receptorkötődéssel egyidejűleg a mágneses nanorészecske jelet adnak, s kirajzolódik a tumor. Mivel a trastuzumab a HER2-höz kötődik, megállítja a tumoros sejtek növekedését és azok pusztulását okozza, tehát a diagnosztizáláson túl a trastuzumab-nak terápiás hatása is van.

Perorális, nazális és pulmonális bevitel

A hordozórendszerek fejlődésével a jelenlegi trendek további beviteli kapukon keresztüli antitest alkalmazást is lehetővé tesznek. Ezek az útvonalak invazívak, könnyebbé teszik az öngyógyszerelést is, így hatékonyabbak lehetnek. Kisebb mennyiségű hatóanyagot tartalmaznak, mivel az alternatív beadási mód segítségével a hatóanyag gyorsabban az alkalmazás helyére juttatható. Néhány tanulmány szerint az i.v. infúzióval bejuttatott antitestek hajlamosabbak a proteolízisre, mint az i.m. injekcióval bejuttatottak. A szacharózzal stabilizált immunglobulinok pedig számos esetben akut veseelégtelenséget váltottak ki i.v. infúzióval történő alkalmazás során.

Az egyik alternatív beviteli mód a *perorális alkalmazás* lehet. Az intesztinális lumenből történő antitestek felvétele a magzati Fc receptorokon keresztül (FcR) valósul meg az enterociták apikális felületén. Ezt a természetes antitest felvétel mechanizmust eredetileg újszülött rágcsálók gasztrointesztinális (GI) traktusát vizsgálva azonosították. Ezt követően tesztelték a receptor jelenlétét a felnőtt szervezetben és megállapították, hogy a felnőtt szervezet is képes expresszálni a receptort antitest adagolást követően. Bár ez az alternatív út életképesnek tűnik, az antitestek stabilitása a GI-traktusban és az endogén antitestekkel történő versengés drámai módon csökkenti a felvétel hatékonyságát perorális kezelést követően. Ezen a speciális mechanizmuson kívül semmilyen más transzcelluláris mechanizmus nem ismert, ami a mAb-okat hatékonyan átjuttatja a GI-traktus hámsejtjein [30].

Sokkal ígéretesebb alternatív beviteli kaput jelent az *intranazális és pulmonális bevitel*. A légzőrendszer kevésbé agresszív környezetet jelent egy beadott fehérje számára mint a GI-traktus. Mindazonáltal a természetes clearance következtében a hatóanyag tartózkodási ideje drasztikusan lecsökken a beadás után; míg ha emulzióban vagy polimer hordozó rendszerben

adjuk be a mAb-ot a clearance lassítható. Aeroszolok és száraz porinhalátorok is kiválóan alkalmazhatók a mAb terápiában [31]. A száraz porinhalátorok formulálásánál fontos paraméter a szemcseméret, aminek 1-5 μm közé kell esnie, hogy a bevitel során lejusson az alkalmazás helyére, ott deponálódjon, a kilégzéssel pedig ne távozzon a légző rendszerből.

IRODALOM

1. Strebhardt, K., Ullrich, A.: Nat. Rev. Cancer. 8, 473-480 (2008).
2. Keith, J., Bell, G. T.: J. Immunol. Methods. 100, 5-40 (1987).
3. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., Winter, G.: Nature. 332, 323-327 (1988).
4. Tyagi, S., Sharma, P. K., Kumar, N., Visht, S.: Int. J. Pharmtech. Res. 3, 459-463 (2011).
5. Pandey, S.: Hybridoma, 1, 17 (2010).
6. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_hu_book/ch05s03.html
7. Deantonio, C., Cotella, D., Macor, P., Santoro, C., Sblattero, D.: Phage display technology for human monoclonal antibodies. Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, 277-295 (2014).
8. Moorthy, B. S., Xie, B., Moussa, E. M., Iyer, L. K., Chandrasekhar, S., Panchal, J. P., Topp, E. M.: Structure of monoclonal antibodies. Biobetters. Springer New York 81-89 (2015).
9. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_2A_6_modul/1150/index.html
10. <http://slideplayer.hu/slide/2109264/8/images/10/A+monoklon%C3%A1lis+antitestek+fej%C5%91d%C3%A9se.jpg>
11. General policies for monoclonal antibodies. World Health Organization. 2009-12-18.
12. <http://slideplayer.hu/slide/2179629/>
13. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003074.pdf
14. Lowe, D., Dudgeon, K., Rouet, R., Schofield, P., Jermutus, L., Christ, D.: Adv. Protein. Chem. Struct. Biol. 84, 41-61 (2011).
15. Folzer, E., Diepold, K., Bomans, K., Finkler, C., Schmidt, R., Bulau, P., Koulov, A. V.: J. Pharm. Sci. 104(9), 2824-2831 (2015).
16. Pace, A. L., Wong, R. L., Zhang, Y. T., Kao, Y. H., & Wang, Y. J.: J. Pharm. Sci. 102, 1712-1723 (2013).
17. Vlasak, J., Ionescu, R.: Taylor & Francis MABs 3, 253-263 (2011).
18. Sangshetti, J. N., Deshpande, M., Zaheer, Z., Shinde, D. B., Arote, R.: Quality by design approach: Regulatory need. Arab. J. Chem. (2014).
19. Jiang, C., Flansburg, L., Ghose, S., Jorjorian, P., Shukla, A. A.: Biotechnol. Bioeng. 107, 985-997 (2010).
20. Jorgensen, L., Nielsen H. M.: Delivery Technologies for Biopharmaceuticals (peptides, proteins, nucleic acids and vaccines). John Wiley and Sons, (2010).
21. Kerwin, B. A.: J. Pharm. Sci. 97, 2924-2935 (2008).
22. Sousa, R.: Acta. Cryst. D. 51, 271-277 (1995).
23. Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., Timasheff, S. N.: Biophys. Chem. 127, 1-8 (2007).
24. <http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/formulation/rapid-formulation-development-for-monoclonal-antibodies/>
25. Pramanick, S., Singodia, D., Chandel, V.: Pharma Times, 45, 65-77 (2013).
26. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000481/human_med_000822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
27. Tebbey, P. W., Varga, A., Naill, M., Clewel, J., Venema, J.: Taylor and Francis MABs 7, 805-811 (2015).
28. Nilanjana D.: Biopharm. Int. 29, 47-52 (2016).
29. Amstead, A. L., Li, B.: Int. J. Nanomed. 6, 3281-3293 (2011).
30. Lencer, W. I., Blumberg, R. S.: Trends. Cell. Biol. 15, 5-9 (2005).
31. Walsh, S., Kokai-Kun, J., Shah, A., Mond, J.: Pharm. Res. 21, 1770-1775 (2004).

KATONA G.; AMBRUS R.; CSÓKA I.; SZABÓ-RÉVÉSZ P.: **The aspects of development of monoclonal antibody containing products from production to formulation**

This article provides an overview of the most important information about monoclonal antibodies (mAbs). It discusses the biotechnological production of mAbs in connection with the regulatory background. Regarding the biological formulation of mAb-containing compositions, it also discloses excipients for stabilization in both liquid and lyophilized form. In a separate section, new challenges of mAbs are summarized. The use of mAbs in tumor and other (e. g. rheumatoid arthritis, psoriasis) therapy is nowadays essential, therefore a knowledge with them is a basic professional requirement.

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszer technológiai és Gyógyszer felügyeleti Intézet
Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

A dolgozathoz tartozó tesztkérdések az utolsó oldalon találhatóak

